

A KUTATÁS EREDMÉNYEI.

Az eredmények tárgyalásánál azokat a megjelent illetve közlésre beküldött közleményeinket, melyek ezen OTKA szerződés támogatásával és a szerződés számának feltüntetésével készültek, vastag betűkkel, a konferencia absztraktokat vastag dőlt betűkkel idézzük. A kutatási program megvalósítása során 17 publikációban közzétettük eredményeinket, egy további közleményünk (**Sperka és mtsai, 2007**) jelenleg revízió alatt van. Egyes részterületeken még a publikálás nem történt meg, ezekben az esetekben elsősorban konferencia absztraktokra hivatkozunk.

1. A kutatás célja, a munkatervben vázolt program ismertetése:

Napjaink egyik legsúlyosabb egészségügyi problémája a HIV vírus által okozott AIDS betegség. Az elmúlt években, elsősorban a HIV-1 proteínázt gátló szerek alkalmazásával, viszonylagos sikereket értek el a terápiában, azonban a fertőzöttek egy jelentős részében, többek között a proteínázban megjelenő mutációk hatására, viszonylag hamar rezisztencia alakul ki. A mutációk hatásának részletes feltérképezése alapvető jelentőségű lehet a rezisztencia elleni küzdelemben. Célunk a rezisztencia során a proteázban megjelenő mutációk következményeinek vizsgálata volt, a mutációkat tartalmazó enzimek katalitikus hatékonyságának, dimer-stabilitásának, specifitásának és potens inhibitorokkal való gátolhatóságának feltérképezése. Tekintettel arra, hogy számos esetben a megjelenő mutációk más retrovírus proteínázokban az adott helyen található oldalláncnak felelnek meg, különböző retrovírusok proteínázainak mutáns változatait is jellemezni kívántuk.

Előzetes kísérleteink alapján a retrovirális proteínázokkal történő hasítás megakadályozható volt egyes szubsztrát oldalláncok foszforilációjával. Foszforilációval szabályozható proteolitikus rendszerek kifejlesztéséhez a szubsztrát foszforilációs folyamatok és a proteolitikus hasíthatóság analízisét terveztük mutáns enzimek előállításával és vizsgálatával.

Kutatócsoportunkban a retrovirális proteínázok specifitásával, aktiválhatóságával és szabályozásával kapcsolatban az elmúlt évtizedben felhalmozott kutatási tapasztalatokat a sejtek működésében alapvető szerepet játszó proteolitikus folyamatok jobb megismeréséhez is fel kívántuk használni. Modellrendszerként az ErbB fehérjékre indukálható "shedding" rendszert terveztünk előállítani.

2. A kutatás eredményeit bemutató részletes szakmai beszámoló

I. *Mutációkat tartalmazó HIV-1 proteínázok specifitásának, gátolhatóságának és dimerstabilitásának részletes feltérképezése.*

ZÁRÓJELENTÉS

Ez a feladat korábbi, OTKA és NIH AIDS-FIRCA támogatással végzett kutatásaink folytatását jelentette. A feladatok egy részét Dr. Irene T. Weber (Atlanta) kutatócsoportjával kollaborációban végeztük. A mi feladatunk az enzimológiai vizsgálatok elvégzése volt, míg Dr. Weber kutatócsoportja vad típusú illetve mutáns HIV-1 proteínázok inhibitor illetve szubsztrátanalóg komplexeinek nagyfelbontású röntgenkristallográfiás szerkezetmeghatározását végezte el. Bár eredetileg elsősorban többszörös mutánsok vizsgálatait terveztük, számos egyszeres mutáns jellemzését is el kellett még végeznünk a többszörös mutánsokkal kapott illetve várt eredmények értelmezhetőségéhez. Korábbi eredményeink alapján ezen mutációk háromféle hatást váltanak ki: befolyásolják a PR dimer stabilitását, megváltoztatják a katalitikus hatékonyságot, ill. módosítják az enzim specificitását.

A gátolhatósági mérésekhez, valamint gátolhatósági profilok megállapításához egy fluoreszcens mikrotiter lemezes mérési módszert állítottunk be a hagyományos HPLC-s mérési módszerrel történő verifikálás felhasználásával (**Bagossi és mtsai, 2004**). A módszer alkalmas volt a HIV-1 proteáz és mutánsainak vizsgálata mellett a humán T-limfotróp vírus (HTLV-1), marha leukémai vírus (BLV) és a Moloney egér leukémia vírus (MMLV) proteázok gátolhatósági profiljának meghatározására is (**Bagossi és mtsai, 2004, Fehér és mtsai 2006, Sperka és mtsai, 2007**). A fluoreszcens mérési módszerek alkalmazhatóságát nagyban befolyásolja az úgynevezett "belső szűrő hatás", amelynek kiküszöbölésére ill. számolására egy új eljárást dolgoztunk ki. A mérési eredmények minél könnyebb feldolgozása érdekében egy számítógépes programot (KiDet) is kifejlesztettünk, amely a mérőműszer által generált elsődleges adatokat (fluoreszcens intenzitás értékek) feldolgozza és a kívánt enzimkinetikai paramétereket (K_M , k_{cat} , K_i , E_0) automatikusan kiszámolja.

Cefalosporin származékokról korábban kimutattuk, hogy azok képesek gátolni a HIV-1 proteázt (Pitlik és mtsai 1996). Tovább folytatva az ezen a területen megkezdett kutatásainkat, egy 126 tagból álló, kombinatorikus kémiai módszerrel szintetizált β -laktám vegyület könyvtárát vizsgáltunk meg, egy nagy áteresztő képességű, mikrotiter lemezen beállított kolorimetrikus módszerrel (**Sperka és mtsai, 2005**). Számos vegyületnél sikerült gátló hatást kimutatni HIV-1 proteázzal szemben. A legjobbakat részletesen is megvizsgálva, kiderült, hogy azok unkompetitív módon gátolják az enzimet, mely gátlási típusra a HIV-1 proteáz esetében eddig nem volt ismert példa. A mechanizmus magyarázatára egy új kötődési módot javasoltunk, amelyben az inhibitor az enzim-szubsztrát komplex "flap" régiójához "kívülről" kötődik. A feltételezésünket molekuláris dinamikai számításokkal támasztottuk alá, azonban tényleges bizonyítékot csak a röntgenkristallográfiái vizsgálatok adhatnak.

ZÁRÓJELENTÉS

Meghatároztuk a kinetikai állandókat a vad típusú és két mutáns (V82A, L90M) HIV-1 proteínázra egy kromogén szubsztrát segítségével (**Mahalingam és mtsai, 2004**). A két mutáció, mely igen gyakran fordul elő rezisztenciákban, gyakorlatilag nem befolyásolta a katalitikus hatékonyságot, míg az indinavir inhibitor kötődése a V82A esetében háromszor gyengébb, az L90M esetében viszont tízszer erősebbnek adódott (**Mahalingam és mtsai, 2004**). A röntgenkristallográfiai szerkezetekkel a gátlási értékek jól értelmezhetőek voltak (**Mahalingam és mtsai, 2004**). Az L24I, I50V és G73S mutánsok esetében mind a kinetikai állandók, mind az indinavir kötődés erőssége lényegesen szélesebb tartományban változott (**Liu és mtsai, 2005**) és a kapott eredmények értelmezését nem csak az indinavirrel meghatározott kristályszerkezetek, hanem szubsztrátanalógokkal történő szerkezetmeghatározások is segítették (**Liu és mtsai, 2005**). Az L24I és I50V csökkent alegységek közötti kölcsönhatása megmutatkozott a növekedett dimerizációs állandókban is (**Liu és mtsai, 2005**). Külön figyelmet érdemelnek a G73S mutánssal kapott eredmények, tekintettel arra, hogy az enzim ezen része sem a dimerizációban, sem a ligandkötésben nem vesz részt. Ugyanakkor a G73S mutáció szubsztráttól függően jelentősen növelte vagy csökkentette a katalitikus állandókat, és jelentősen befolyásolta a gátlási állandókat is. A kristályszerkezetek alapján a mutáció olyan hidrogénhid-átrendeződésekhez vezetett, melyek befolyásolták a szubsztrátkötő zsebek szerkezetét is (**Liu és mtsai, 2005**). A rezisztencia kialakulásának jobb megértéséhez a vad típusú valamint két mutáns (V82A, I84V) enzim gátolhatóságát vizsgáltuk redukált peptidkötést tartalmazó szubsztrátanalógok segítségével, valamint ugyanezen inhibitorokkal készült kristályszerkezetek elemzésével (**Tie és mtsai, 2005**). A szerkezeti vizsgálatokkal alátámasztott eredmények arra utaltak, hogy a mutánsok gátolhatóságát jelentősen befolyásolta a szubsztrátanalógok konformációs flexibilitása, valamint a szubsztrátanalógok általában nagyobb flexibilitásuk miatt általánosan jobban képesek voltak a mutációk következtében elvesző kölcsönhatások helyettesítésére, mint a klinikai gyakorlatban használt, lényegesen merevebb szerkezetű inhibitorok. Ez a megfigyelés magyarázatul szolgál arra is, hogy a rezisztens proteázok miért képesek mégis kellő hatékonysággal bontani a szubsztrátokat (**Tie és mtsai, 2005**). Ezen két mutánsnak saquinavirral történő gátolhatóságát és saquinavirral készült kristályszerkezeteit is elemeztük, egy harmadik generációs inhibitorral, a darunavirral alkotott komplexekkel összevetve (**Tie és mtsai, 2007**). A saquinavir-proteáz kölcsönhatások nagyon hasonlóknak bizonyultak, jó egyezéssel a nagyon hasonló gátlási állandókkal: a 79-82-es proteáz régió flexibilis módon képes a ligandhoz illeszkedni, és úgy tűnik, hogy a régió konformációja a ligand (inhibitor) természetétől és nem a régióban lévő mutáció(k)tól függ (**Tie és mtsai, 2007**). Multidrug rezisztens proteázok vizsgálatához antivirális terápiában résztvevő betegekből izolált, több proteáz inhibitorra is rezisztens HIV-1 proteázokat kívántunk megfelelő vektorrendszerben expresszálni, tisztítani és a vad típusú HIV-1 proteázzal összehasonlítani. A

ZÁRÓJELENTÉS

klónozás során az általunk korábban kifejlesztett MBP-his6 rendszert használtuk (**Fehér és mtsai 2004**) három, többszörös mutációkat tartalmazó proteáz előállítására, azonban a Xa proteáz hasítási helyének a P1' Pro elé történő glicin inzercióval történő módosítása után sem sikerült processzált enzimet előállítanunk, ezért ez az expressziós rendszer további módosításokat igényel. Ugyanakkor a fúziós fehérje a HIV-1 proteáz Gag-Pol fehérjefúziós formában lévő állapotának modellezésére kiválóan alkalmas, ezért a fúziós fehérjék összehasonlító specificitás-vizsgálata mellett döntöttünk. A fehérjéket baktériumban expresszáztattuk és a fúziós fehérjéket tisztítottuk. A vad és mutáns fúziós HIV-1 proteázok feltekeredési képességét aktív centrum titrálással ellenőriztük, illetve a specificitásukat a HIV-1 mátrix/kapszid hasítási hely szekvenciáján alapuló szubsztrátsorozattal hasonlítottuk össze. A molekuláris modellezés alapján várt predikciókkal összhangban a specificitási változásokat főleg az S1 és kisebb mértékben az S3 zsebek növekedését tapasztaltuk. (**Bander és mtsai, 2006**).

A retrovirális proteázoknak a vírusfertőzés korai fázisában játszott szerepe régóta felvetett, azonban mind a mai napig nem egyértelműen bizonyított elmélet (**Tózsér és Oroszlan, 2003**). A korai fázisban az elsődleges szubsztrátnak a nukleokapszid fehérje tűnik, ezért ennek hasításával kapcsolatban részletes szubsztrát-mutagenézis és kinetikai vizsgálatokat végeztünk (**Tózsér és mtsai, 2004**) valamint a mutációkat a HIV vírusba is bevittük (**Tózsér és mtsai, 2006**). Eredményeik szoros korrelációt mutattak a vírusok fertőzőképessége és a nukleokapszid fehérje proteolitikus érzékenysége között (**Tózsér és mtsai, 2006**).

A specificitás és a katalitikus hatékonyság mellett a dimerstabilitás is egy fontos jellemzője a retrovirális proteázoknak. Azonban ennek meghatározása vagy a körülményesen kivitelezhető ultracentrifugás módszerrel, vagy az aktivitás mérésre visszavezethető urea-disszociációs módszerrel lehetséges. Ez utóbbi hátránya, hogy nem független paraméterként jelenik meg a dimer disszociációs állandója. Mindezek figyelembe vételével ki kívántunk fejleszteni egy olyan, a dimerizáció mérésére alkalmas, FRET alapú módszert, melyben a proteáz kódoló szakaszt fluoreszcens fehérjével (YFP ill. CFP) fuzionáltatva állítjuk elő, ezeket heterodimerjeit hozzuk létre, és közvetlenül vizsgáljuk a dimer stabilitását denaturáló ágensek (pl. urea) koncentrációjának függvényében. Ezen konstrukciók elkészültek, de a HIV-1 proteáz-YFP (és CFP) fúziós fehérjék rendkívül rosszul oldódtak, ezért ezt a megközelítést elvetettük. Az eredetileg tervezett munka folytatása helyett elkészítettünk egy olyan mutánst, melynek C-terminálisához egy extra Cys oldalláncot klónoztunk be (az általunk használt stabilizált HIV-1 proteáz az eredeti két Cys oldallánca helyett alalin oldalláncokat tartalmaz), és ezt Cy5 illetve Cy3- molekulákkal jelöltük. Jelenleg a heterodimerizációs FRET alapú méréseket végezzük ebben - az előkísérletekben biztató eredményeket szolgáltató - rendszerben (Bander és mtsai, nem közölt eredmények).

II. Retrovirális proteínázok specificitásának és gátlhatóságának részletes feltérképezése.

Korábbi specificitás-vizsgálataink nem korlátozódtak a vad-típusú HIV-1 proteínázra, hanem néhány modell-retrovírus proteolitikus enzimjének specificitását is részletesen vizsgáltuk. Célul tűztük ki egyrészt további retrovirális proteázok klónozását, specificitásának jellemzését, valamint ezen enzimekbe olyan mutációkat kívánunk bevenni, melyek segítségével a HIV-1 proteínáztól eltérő specificitásuk értelmezhetővé válik. A különböző expressziós rendszerekben klónozott MMLV proteolitikus enzimjét (**Fehér és mtsai, 2004**) oligopeptid szubsztátokkal, valamint rekombináns Gag fehérjékkel is jellemeztük, az enzim inhibitor profilját fluoreszcens mikrotiter-lemezes módszerrel határoztuk meg (**Fehér és mtsai, 2006**). A HIV mellett a HTLV a másik humán retrovírus, amelyik emberben betegséget okoz. A HIV-hez hasonlóan a HTLV proteínáz gátlása reményt adhat ezen betegségek befolyásolására (**Tözsér és Weber, 2007**). Különböző retrovírusok természetes hasítási helyeit reprezentáló oligopeptid sorozatokkal összehasonlítottuk a HTLV-1 és HIV-1 proteínázok specificitási állandóit, amely alapján a HTLV-1 proteáz szubsztrátspecificitása jóval szűkebbnek bizonyult (**Kádas és mtsai, 2004**). Helyspecifikus mutagenézissel a szubsztrátkötő helyen HIV-1-szerű mutációkat tartalmazó HTLV-1 proteázokat állítottunk elő. Ezek közül több inaktívnak bizonyult, de az aktivak is jóval alacsonyabb feltekeredési hatékonysággal rendelkeztek, mint általában a HIV-1 proteáz mutánsok. A HTLV-1 természetes (kapszid/nukleokapszid) hasítási helyén alapuló, egyszeres aminosavcseréket tartalmazó oligopeptid sorozatokkal vizsgálva, a mutánsok szubsztrátspecificitása a vártnak megfelelően a HIV-1 proteáz specificitása irányában változott (**Kádas és mtsai, 2004**). Hasonló következtetést vonhattunk le a gátlási profil meghatározásából is. A “flap” régióban mutációkat tartalmazó proteáz analízise rámutatott a “flap” szubsztrátspecificitást befolyásoló szerepére is. A kinetikai adatok jobb értelmezése érdekében felépítettük a mutáns HTLV-1 proteázok molekuláris modelljeit is, amelyekkel jól tudtuk magyarázni a megfigyelt változásokat. Számos egyszeresen mutáns illetve mutációk kombinációit tartalmazó BLV proteínázt állítottunk elő (**Sperka és mtsai, 2007**). Ezek a mutánsok a HIV-1 proteínáz megfelelő oldalláncait tartalmazták. A korábban a HTLV-1 proteínázra kapott eredményekhez hasonlóan a mutánsok egy jelentős része inaktívnak bizonyult. Egy HIV-1 természetes hasítási helyet (VSQNY*PIVQ) reprezentáló oligopeptid sorozattal végzett korábbi szubsztrátspecificitási vizsgálatainkat kiegészítettük, úgy hogy az adatsor már 11 retrovirális proteáz adatait tartalmazza (**Bagossi és mtsai, 2005b**). Az ilyen széles körű vizsgálatok nem csak a retrovirális proteázok általános tulajdonságainak felderítésében játszhat szerepet, de a rezisztens HIV-1 proteázok ellen hatásos inhibitorok tervezéséhez is segítséget nyújthat. Először a retrovirális proteázok specificitásában fontos szerepet betöltő P2 helyet vizsgáltuk, az ezen a helyen egyszeres aminosav cseréket tartalmazó peptidsorozattal (**Bagossi és mtsai, 2005**). Három specificitási csoportot tudtunk elkülöníteni: az egyik a kis méretű, hidrofób aminosavakat részesíti előnyben, a

ZÁRÓJELENTÉS

másik a nagy hidrofób aminosavakat kedveli, míg a harmadik csoport a poláros aminosavak felé mutat preferenciát. A specificitási hasonlóságok és különbségek alapján elkülönített csoportok jól korreláltak a retrovírus proteázok szekvenciája alapján elvégzett filogenetikai analízissel és a retrovírusok taxonómiai besorolásával. A mérési eredményeket jól tudtuk értelmezni a már meglévő kristályszerkezetekkel, ill. az ezek alapján felépített modelljeinkkel. Fő következtetésünk, hogy a HIV-1 PR P2 specificitása inkább kivételnek számít a retrovirális proteázok családjában, hiszen az összes többi vizsgált enzim a hidrofób aminosavakat részesíti előnyben a P2 helyen. Ezen adatok segítséget nyújthatnak széles specificitású, a rezisztens vírustörzseket is gátló inhibitorok kifejlesztéséhez. A vizsgált proteázok további alhelyeinek feltérképezése jelenleg is folyik (Eizert és mtsai, nem közölt eredmények).

A HIV és a HTLV mellett a harmadik, az embert megfertőzni képes retrovírus a humán foamy vírus (HFV), azonban máig nincs bizonyíték arra, hogy a különböző betegségekben szenvedő betegekből izolált vírus és a betegség között ok-okozati összefüggés lenne. A foamy vírusok életciklusa több szempontból is különbözik a többi retrovírusétól, azonban a Pol poliprotein N-terminálisán található aszpartil proteáz a HFV esetében is nélkülözhetetlen a vírus fertőzőképességéhez. További vizsgálataink elősegítéséhez optimalizálnuk kellett az enzim tisztításának módszerét (**Boross és mtsai, 2006**). Több, nagyfelbontású retrovirális proteáz kristályszerkezete alapján homológ modellezéssel jósoltuk a HFV proteáz szerkezetét, majd megpróbáltuk megjósolni a HFV proteáz különleges sajátságaiért (magas pH optimumért, alacsony stabilitásért, különleges szubsztrátspecificitásért) felelős aminosavrészeket. Ezeket az aminosavrészeket helyspecifikus mutagenezissel olyanokra cseréltük, mint amilyenek gyakran előfordulnak a többi retrovirális (pl. HIV-1) proteázban, és vizsgáltuk a mutáns enzimek pH optimumát, denaturáló ágenssel szemben mutatott stabilitását, összehasonlítva a vad típusú HFV és HIV-1 proteázok tulajdonságaival. A stabilitás vizsgálatok a várt eredményt (a mutánsok nagyobb dimerstabilitását) hozták, azonban a mutánsok pH optima a várttal ellentétben nem csökkent, hanem emelkedett. Az egyszeres mutációkat tartalmazó HFV proteázok vizsgálata után többszörös mutációkat tartalmazó enzimeket is előállítottunk, és vizsgáltuk azok pH optimumát és ureával szemben mutatott stabilitását. Méréseink alapján úgy tűnik, hogy a HFV proteáz magasabb pH optimumáért nem elsősorban az aktív centrum környezetében található disszociábilis aminosavak, hanem az enzim dimerstabilitását meghatározó aminosavak a felelősek (**Sperka és mtsai, 2006**).

III. Szubsztrát foszforiláció hatása a retrovirális proteínázok specificitására.

Korábbi, HIV-1 proteázzal kapcsolatos foszforilációs vizsgálatainkat kiterjesztettük az MMLV proteázának vizsgálatával. P4 helyen szerin-foszforilált szubsztát (VS^PQNY^*PIVQ) esetén nem

ZÁRÓJELENTÉS

tapasztaltunk jelentős különbséget a kinetikai állandókban, ezzel szemben egy P2 helyen foszforilált szubsztrát esetében (TSRS^PL*YASSP) a foszforiláció jelentősen lecsökkentette a szubsztrát hasíthatóságát (Fehér és mtsai, nem közölt eredmények). Mutagenézis vizsgálatokhoz végül a kaszpáz-3 enzimet választottuk, mert a retrovirális proteázokkal kapott előzetes eredményeink alapján csak P1 módosítás esetén lett volna várható drasztikus katalitikus hatás, mely szükséges lett volna a molekuláris „ki/be” kapcsoló létrehozásához, azonban a retrovirális proteázok P1 helyen kifejezetten nem tolerálják a negatív töltésű oldalláncokat. Ugyanakkor a kaszpázok negatív töltésű oldalláncok, nevezetesen P1 Asp mellett hasítanak valamint szubsztrát foszforilációra szintén érzékenyek (Tözsér és mtsai, 2003), így kézenfekvő volt a kaszpáz-3 S1 zsebének foszfoszerin befogadására alkalmas formára mutálása. Molekuláris modellezés alapján egy Q161G + S213R + R64Q + R207T tetramutáns lépcsőzetes előállítását tűztük ki célul. Sajnálatos módon azonban a kaszpáz-3 feltekeredése is rendkívül érzékenynek mutatkozott az S1 zseb mutációira: a létrehozott egyszeres mutánsok közül csak egyedül az S213R mutáns mutatott önprocesszálo aktivitást. A Kaszpáz-3 enzimmel kapcsolatos vizsgálataink ugyanakkor feltárták egy S5 szubsztrátzseb létezését (Fang és mtsai, 2006).

IV. Szignálútvonalak proteolitikus szegmenseinek vizsgálata retrovirális proteínázok felhasználásával.

Kutatócsoportunkban a retrovirális proteínázokkal kapcsolatban az elmúlt évtizedben felhalmozott kutatási tapasztalatokat a sejtek működésében alapvető szerepet játszó proteolitikus folyamatok jobb megismeréséhez is fel kívántuk használni. Modellrendszerként az ErbB2 fehérjére indukálható “shedding” rendszert terveztünk előállítani. A receptor leválás jelenségét már leírták az erbB2 fehérjére is, melynek szolubilis formája nem csak tenyésztett sejtvonalak felülúszójából mutatható ki, hanem emlőtumoros betegek véréből is, így diagnosztikus marker lehet. Az indukálható hasítási rendszer kialakításához elépítettünk egy molekuláris modellt a teljes hosszúságú ErbB2 molekulára, és jósoltuk a “shedding” helyét (**Bagossi és mtsai, 2005a**). Az Erb fehérjék leválásának vizsgálatára egy - általunk előállított - ErbB2-YFP fluoreszcens fúziós fehérjét kódoló plazmid módosítását választottuk. Ebben a fehérjében a molekuláris modellezéssel jósolt „shedding” hely 11 aminosavhosszúságú szakaszát helyspecifikus mutagenézissel úgy módosítottuk, hogy HIV-1 proteínáz által hasítható legyen. Az eredeti ill. a mutált fúziós fehérjét kódoló plazmidot, lipofektin segítségével endogén ErbB2-t nem expresszálo CHO, valamint endogén erbB2-t nagymértékben expresszálo SKBR-3 sejtekbe transzfektáltuk. A vad típusú erbB2 szekvenciát tartalmazó konstrukcióval transzfektált CHO-sejtekben a transzfekció után 2 nappal a sejtek 80%-ánál megjelent a fluoreszcens erbB2 fehérje a membránban, de az ER és a Golgi is erőteljesen világított, ami arra utalt, hogy sok fehérje maradt ezen kompartmentekben. Ezzel szemben az SKBR3-sejtek membránja erősen fluoreszkált, ugyanakkor nem tapasztaltunk

ZÁRÓJELENTÉS

citoplazmatikus festődést. A shedding mutáns konstrukció sem a CHO, sem az SKBR-3 sejtekben nem jutott ki kellő mértékben a membránba. Valószínűleg a mutáció túl közel volt a transzmembrán régióhoz és ez zavarta a membránba történő beilleszkedést. Az Egyetemünk Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetével kollaborációban megpróbáltunk stabilan transzfektált, a shedding-mutáns fehérjét a membránba juttató CHO sejtklónokat létrehozni, úgy, hogy a sejtek populációjából membránfluoreszcenciát mutató klónokat klónozó cilinderrel kiemeltük, és ezeket tenyésztettük tovább. A transzfekció alacsony stabilitása miatt a klónozást 5 ciklusban ismételtük, majd nagy sebességű áramlási citometriás sejtseparálást alkalmazva 5 ciklusban dúsítottuk a YFP-pozitív sejteket. Az így létrehozott populáció mindössze 5 %-ban mutatott membrán fluoreszcenciát, így a továbbiakban a sejteket extracellulárisan Alexa647-2C4 anti-ErbB2 monoklonális antitesttel is jelöltük szeparálás előtt, és a kettős pozitív, tehát transzmembrán YFP-ErbB2 mutánst tartalmazó sejteket szelektáltuk. A szeparálás eredményét konfokális mikroszkóppal ellenőrizve a sejtek >90%-ban mutattak membránfluoreszcenciát. Az így létrehozott sejtvonalat HIV-1 proteázzal kezeltük és áramlási citometriával mértük az intracelluláris (YFP fluoreszcencia) és extracelluláris (Alexa647-2C4 fluoreszcencia) ErbB2 domének arányának változását. A YFP/Alexa647 hányados növekedése kis mértékű volt, feltételezhetően azért, mert az enzim hozzáférése a specifikus hasítási helyhez szterikusan gátolt lehet. A továbbiakban olyan „shedding” mutáns létrehozását tervezzük, amelyben a hasítás a membrántól távolabbi helyen történik. A kidolgozott áramlási citometriás szelektációs módszer lehetőséget ad arra, hogy a létrehozandó transzfektánsok szelekcióját és proteáz érzékenységének tesztelését gyorsabban és hatékonyabban végezhessük. *(Juhász és mtsai, 2004)*

Idézett irodalom:

- Bagossi, P., Kádas, J., Miklóssy, G., Boross, P., Weber, I.T. and Tözsér, J. (2004) Development of a microtiter plate fluorescent assay for inhibition studies on the HTLV-1 and HIV-1 proteinases. *J. Virol. Methods*, **119**, 87-93.
- Bagossi P., Horváth, G., Vereb, G., Szöllösi, J. and Tözsér, J. (2005a) Molecular modeling of nearly full length ErbB2 receptor. *Biophys. J.* **88**, 1354-1363.
- Bagossi, P., Sperka, T., Fehér, A., Kádas, J., Zahuczky, G., Miklóssy, G., Boross, P. and Tözsér, J. (2005b) Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *J. Virol.* **79**, 4213-4218.
- Bander, P., Bagossi, P., Tözsér, J. *Multidrog rezisztens HIV-1 proteínázok klónozási stratégiája, tisztítása és enzimkinetikai jellemzése. MBKE Vándorgyűlése, 2006 Aug. 30-Szept. 2, PTE-ÁOK, Pécs.*
- Boross, P., Tözsér, J. and Bagossi, P. (2006) Improved purification protocol for wild-type and mutant human foamy virus proteases. *Protein Express. Purif.* **46**, 343-347.
- Fang B., Boross, P., Tözsér, J. and Weber, I.T. (2006) Structural and kinetic analysis of caspase-3 reveals role for S5 binding site in substrate recognition. *J. Mol. Biol.* **360**, 654-666.
- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., Oroszlan, S. and Tözsér J. (2004) Expression of the murine leukemia virus protease in fusion with maltose binding protein in *Escherichia Coli*. *Protein Expression and Purification.* **35**, 62-68

ZÁRÓJELENTÉS

- Fehér, A., Boross, P., Sperka, T., Miklóssy, G., Kádas J., Bagossi, P., Oroszlan, S., Weber, I.T. and Tözsér, J. (2006) Characterization of the murine leukemia virus protease and its comparison with the human immunodeficiency virus type 1 protease. *J. Gen. Virol.* 87, 1321-1330.
- Juhász, J., Miklóssy, G., Fehér, A., Friedlander, E., Horváth, G., Bagossi, P., Tözsér, J., Vereb, Gy., Szöllősi, J.: *ErbB2 „shedding” mutáns expresszálo CHO sejtvonal előállítás és jellemzése. IV. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, 2004. Május 6-8. Budapest.*
- Kádas, J., Weber, I.T., Bagossi, P., Miklóssy, G., Boross, P., and Tözsér, J. (2004) Narrow substrate specificity and sensitivity towards ligand binding site mutations of human T-cell leukemia virus protease. *J. Biol. Chem.* 279, 27148-27157.
- Liu, F., Boross, P.I., Wang, Y.F., Tözsér, J., Louis, J.M., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2005) Kinetic, stability, and structural changes in high-resolution crystal structures of HIV-1 protease with drug-resistant mutations L24I, I50V, and G73S. *J. Mol. Biol.* 354, 789-800.
- Mahalingam, B., Wang, I.F., Boross, P., Tözsér, J., Louis, J.M., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2004) Crystal structures of HIV protease V82A and L90M mutants reveal changes in indinavir binding site. *Eur. J. Biochem.* 271, 1516-1524.
- Pitlik J., Bagossi, P., Jeko, J. and Tözsér, J. (1996) Synthesis of cephalosporin oligopeptides as potential proteinase inhibitors. *Pharmazie*, 51, 700-704.
- Sperka, T., Pitlik, J., Bagossi, P. and Tözsér, J. (2005) Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 15, 3086-3090.
- Sperka, T., Boross, P., Eizert, H., Tözsér, J. and Bagossi, P. (2006) Effect of mutations on the dimer stability and pH optimum of the human foamy virus protease. *Protein Eng. Des. Sel.* 19, 369-375.
- Sperka, T., Miklóssy, G., Tie, Y., Bagossi, P., Zahuczky, G., Boross, P., Matúz, K., Harrison, R.W., Weber, I.T. and Tözsér, J. (2007) Bovine leukemia virus protease: comparison with human T-cell leukemia virus and human immunodeficiency virus proteases. *J. Gen. Virol.* Under revision.
- Tie, Y., Boross, P., Wang, Y.F., Gaddis, L., Liu, F., Chen, X., Tözsér, J., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2005) Molecular basis for substrate recognition and drug resistance from 1.1-1.6 Å resolution crystal structures of HIV-1 protease mutants with substrate analogs. *FEBS J.* 272, 5265-5277.
- Tie, Y., Kovalevsky, A.Y., Boross, P., Wang, Y.F., Ghosh, A.K., Tozser, J., Harrison, R.W. and Weber, I.T. (2007) Atomic resolution crystal structures of HIV-1 protease and mutants V82A and I84V with saquinavir. *Proteins.* 2007 Jan 22; [Epub ahead of print]
- Tözsér, J. and Oroszlan, S. (2003) Proteolytic events of HIV-1 replication as targets for therapeutic intervention. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1803-1815.
- Tözsér, J., Bagossi, P., Zahuczky, G., Majerova, E., Specht, S. and Copeland, T.D. (2003) Effect of caspase cleavage site phosphorylation on proteolysis. *Biochem. J.* 372, 137-143.
- Tözsér, J., Shulenin, S., Louis, J.M., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (2004) Processing of wild type and mutant HIV-1 nucleocapsid proteins by the HIV-1 proteinase. *Biochemistry*, 43, 4304-4312.
- Tözsér, J., Shulenin, S., Young, M.R., Briggs, C.J., and Oroszlan, S. (2006) Replication-dependent fitness recovery of Human immunodeficiency virus 1 harbouring mutations of Asn17 of the nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 87, 961-965.
- Tözsér, J. and Weber, I.T. (2007) Human T-cell leukemia virus protease as a potential target for antiretroviral therapy. *Curr. Pharm. Des.* In press.